

Hvordan bruke YEPD og andre vekstmedium

Truls Rasmussen

Siv. ing, Industriell kjemi og Bioteknologi

truls.c.r@brewshop.no

February 8, 2019

Hvis man har et lite eller stort sortiment av nedfrosne mikrobiologiske kulturer; *Saccharomyces*, *Brettanomyces*, og eller *Lactobacillus*, kan det alltid være en utfordring hvis man har dårlig merking eller få en krysskontaminering av én eller flere stammer.

Ved å benytte seg av YEPD agarskåler vil man få muligheten til å starte med blanke ark ved hver med runde propagering. Dette minimerer risikoen for kontaminering, og man vet utgangspunktet sitt.

Yeast extract peptone dextrose (YEPD) og liknende vekstmedium er et vanlig brukt redskap benyttet innen mikrobiologi for å propagere mikroorganismer hvor formålet er å produsere flere celler. YEPD medium består av 1 % gjærekstrakt, 2 % pepton og 2 % glukose. Ofte kombineres YEPD med agar og petriskåler for å lage agarplater. Figur 1 viser en *saccharomyces cerevisiae* variant kontaminert med en *lactobacillus* ved å benytte agarskåler

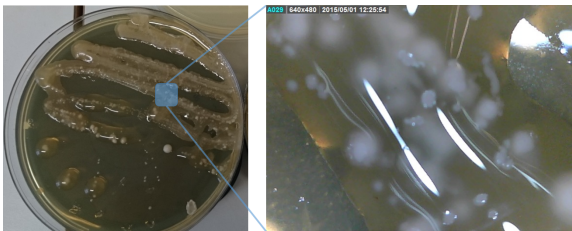


Fig. 1. En *saccharomyces cerevisiae* danner runde hvite kolonier på agarskål, *lactobacillus*kontamineringen lager i dette tilfellet et gulaktig slim.

Med mindre det ikke er et ønsket resultat i ølet, vil Figur 1 være et problem. Her har en annen mikroorganisme enn den ønskede *S. cerevisiae* funnet veien inn i kulturen, og vil påvirke sluttresultatet. I dette tilfellet er det da mulig å plukke en koloni som ikke har kontamineringen, propagere på nytt før man gjør et nytt utstyr for å sjekke om man har plukket vekk kontamineringen. Dette vil da bli utgangspunktet for en ny renkultur av stammen din.

Agarskåler kan benyttes til mange formål for en hjemmebrygger.

- Plate ut frysekulturer for å plukke enkeltkolonier for propagering - du vil unngå fryse-tine sekvenser som kan skade kulturen hvis du ikke bruker hele ampullen (cryorør).
- Sjekke for kontamineringer i eksisterende øl.
- Høste gjær fra kommersielle bryggerier ved å benytte morfologien (utseende) på agarskålen - med utgangspunkt at ølet ikke er filtrert og pasteurisert.

- Gjøre enkle celtellinger av koloniformende enheter.

Utstyr og kjemikalier

- Blåkork-flaske (3.3 borosilikatglass)
- Agar pulver
- YEPD ampuller, spraymalt
- Petriskåler
- Sentrifugerør
- Pipetter
- Pøseøser/tannpirker
- Strykepinne
- Desinfiserende væske
- Bunsenbrenner, primus eller annen type gassbrenner

Generelle sterilteknikker å ta hensyn til for å oppnå et godt resultat

- Ha en ren og ryddig overflate å jobbe på. Desinfiser benkplaten med f.eks Star-San, Sirafan-speed eller andre desinfiserende væsker.
- Benytt en gassbrenner til å både sterilisere flaskehalsen på en borosilikatflaske, ølflaske og annet utstyr som tåler varme. Utstyr skal dras veldig raskt igjennom uten lang kontakttid (0.5 sek er nok). En gassbrenner vil også ha som funksjon i å danne en "paraply" av steril luft mens den er i bruk.
- Aldri berør tuppen av en podenål, strykepinne, pipette eller annet utstyr som skal være i direkte kontakt med prøven din. Er du i tvil så kaster du den og tar en ny.
- Skrulokk eller andre forseglinger skal ikke ligge med lokket ned på benkplaten. Benyttes en gassbrenner er det bedre at lokket ligger opp.
- Bruk hansker, nitril-hansker er et fint alternativ da det er lett å desinfisere dem både med alkohol og syre (Star-san), samtidig som at man har god mobilitet i hendene.
- Merk prøvene dine godt, både med hva det er og dato. Spritfast tusj er optimalt.
- Det er bedre å desinfisere en gang for mye.

Fremgangsmåte - nok til støping av 20 agarskåler med 9 cm diameter

1. Vei inn 10 g Agar sammen med 5 ampuller YEPD medium og la svulle i 15 minutter til 500 mL romtemperert springvann i en blåkork-flaske.
2. Desinfiser (kok opp) blandingen i en mikrobølgeovn, unngå støtkoking - skru korken på slik at den gir litt etter.
3. Bland løsningen forsiktig, unngå luftbobler og kjøøl ned flasken til ca 60 °C.
4. Fordel blandingen jevnt i 20 agarskåler. 25 mL per plate, eller til en høyde på litt under 0.5 cm

Når du heller blandingen over i skålene, er det nok å fylle skålen halvveis, så legger du forsiktig lokket over og rører rundt på skålen for å fordele løsningen jevnt.

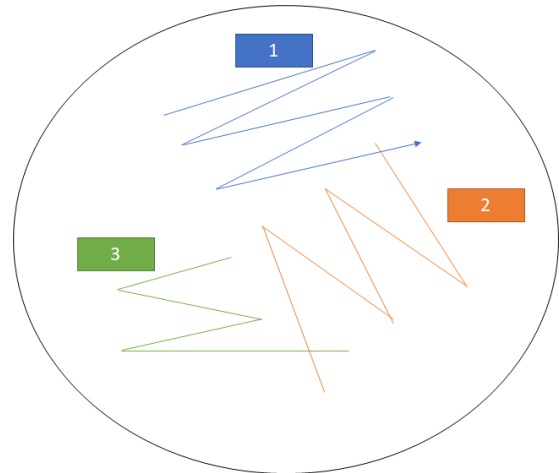


Fig. 2. Prosedyre for utplating av mikroorganismer

Fremgangsmåte - Stryke ut frysekultur til gjærstarter

1. Ta en steril pøse eller tannpirker borti kulturen din mens den fremdeles er frossen.
2. Stryk ut på agar, som vist i Figur 2. Du stryker ut i sikk-sakk som illustrert i Figur 2 (1). Så benytter du en ny pødenål, stryker igjennom den siste "streken" for å dra med deg litt av væsken på en ny runde sikk-sakk (2). Til slutt tar du en siste pødenål og drar sikk-sakk igjennom siste del av platen (3).
3. La platen inkuberes ved romtemperatur i et par døgn til det dannes synlige kolonier
4. Plukk en enkeltkoloni ved å dra en tannpirker eller pødenål igjennom kolonien, overfør den til en 250 mL E-kolbe med 5 % Spraymalt for propagering.
5. Dekanter og overfør til en større E-kolbe med 10 % Spraymalt til ønsket gjærmengde.

Fremgangsmåte - Kontamineringssjekk

1. Pipetter ut 100 µL fra et øl du tror er kontaminert på en agarskål. Alternativt kan en pøse og prosedyren vist i Figur 2 benyttes.
2. Bruk en strykepinne til å fordele væsken jevnt ut over agarskålen
3. Inkuber gjerne ved 30 °C for at kontamineringen skal vokse raskere.

Hvis det observeres noe som er vist i Figur 1, et slimaktig produkt, vil det tyde på en *Lactobacillus* kontaminering. *Brettanomyces* kontaminering kan være vanskeligere å se morfologisk^a. Figur 3 viser *Brettanomyces bruxellensis* som vokser på MYPG (Malt ekstrakt, gjærekstrakt, pepton og glukose) agarplater.

^a Morforlogi beskriver utseende, struktur og formen til en organisme

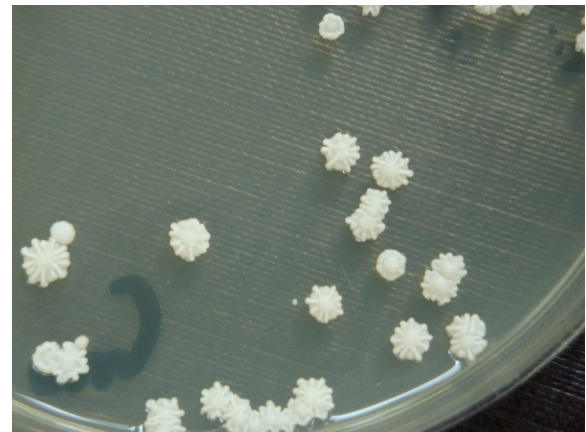


Fig. 3. *Brettanomyces bruxellensis* produserer en unik koloniform, som ser ut som en blomst

Fremgangsmåte - Isolering av gjær basert på morfologi fra kommersielle bryggeri

For å isolere gjær fra et kommersielt bryggeri, kan man fortynne gjærslanten i bunn av en flaske med desinfisert springvann. 50 - 100 mL vann er nok. En pødenål benyttes til å stryke ut gjærslanten på en agarskål, som beskrevet i Figur 2. Inkuber til synlige kolonier. Så kan du propagere ved å benytte samme fremgangsmåte for utstyr av frysekultur til gjærstarter.

Hvis et bryggeri bruker karboneringsgjær kan man være heldig og plukke ut den originale gjæren hvis den ikke er filtrert og pasteurisert. Ved å plate ut en fortynnet gjærslant fra en flaske på agarskål, kan man observere morfologiske forskjeller. Ser man to distingte morfologier kan man plukke begge to, propagere dem og lage en delt batch at et brygg. Er man

heldig har man klart å plukke ut den originale stammen.

Fremgangsmåte - Enkel celletelling basert på koloniformende enheter

Ved å plate ut en dekanisk forfynningsrekke får du muligheten til å gjøre enkle celletellinger

1. Tilsett 9 mL rent vann i en rekke på 7 sentrifugerør.
2. Lag til en homogen blanding eller et kjent utgangspunkt for starteren eller ølet ditt.
3. Overfør 1 mL starter/øl til et rør med 9 mL vann. Bland godt og overfør 1 mL til neste rør som vist i Figur 4.
4. Pippeter ut 0.1 mL fra en forfynning over på agarskålen.
5. Bruk en strykepinne til å fordele prøven jevnt ut.
6. Merk platene med riktig forfynning og la dem inkubere i opptil en uke
7. Tell antall kolonier og benytt Likning 1 for å finne antall koloniformende mikroorganismer/mL

Plater som inneholder noe mellom 20 og 200 kolonier er optimalt for telling. Det å telle koloniformende enheter antar at en celle gir opphav til en koloni. Men mange mikroorganismer klumper seg sammen og vokser som en koloni. Så det faktiske celleantallet vil alltid være høyere enn det som er talt.

$$koloniformende = \frac{\text{Antall}}{\text{Volum}} \times (\text{Fortynning}) \times (\text{Konverteringsfaktor}) \quad [1]$$

For eksempel Si at man teller 57 kolonier på agarplaten merket med 10^7 . Da løses likning 1 slik:

$$koloniformende(CFU) = \frac{57CFU}{100\mu L} \times (10^7) \times \left(\frac{1000\mu L}{mL}\right)$$

$$CFU = \frac{5.7 \times 10^9}{mL}$$

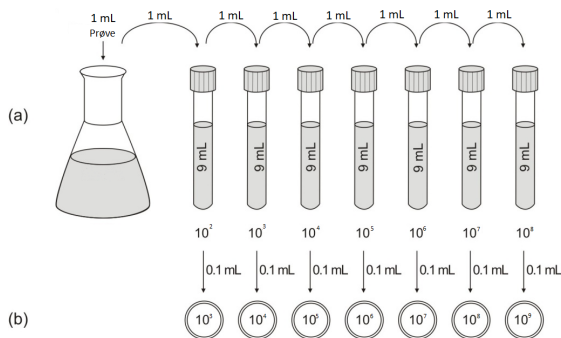


Fig. 4. Illustrasjon av en dekanisk forfynningsserie for å estimere celleantall. A viser forfynningserien, og B viser volumet platet ut for å gi riktig celletall